云 南 植 物 研 究 2001, 23 (1): 67~71
Acta Botanica Yunnanica

根癌农杆菌对栝楼的遗传转化

雷和田[1], 宋经元[1], 祁建军[1], 张荫麟[1], 杨峻山[1], 郭志刚[2]
(1 中国医学科学院协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2 清华大学化学工程系, 北京 100084)

摘要: 用根癌农杆菌侵染栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim.) 无菌苗后, 获得其冠瘿组织; 栝楼冠瘿组织经除菌后能在无激素的 MS 培养基上良好生长, 并合成冠瘿碱, 表明 Ti 质粒转化成功。栝楼冠瘿组织中最高蛋白含量为 130.6mg/g (鲜重)。经 SDS-PAGE 检测其含有的蛋白种类与栝楼根含有的基本一样。研究表明, 利用栝楼冠瘿组织作为培养系统生产天花粉蛋白有很好的开发前景。

关键词: 栝楼; Ti 质粒转化; 冠瘿组织培养
中图分类号: Q 943, Q 78 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700(2001)01-0065-05

Genetic Transformation by Ti Plasmid in *Trichosanthes kirilowii*

LEI He-Tian[1], SONG Jing-Yuan[1], QI Jian-Jun[1], ZHANG Yin-Ling[1], YANG Jun-Shan[1], GUO Zhi-Gang[2]
(1 *Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Science, Peking Union Medical College*, Beijing 100094, China; 2 *Department of Chemical Engineering of Tsinghua University*, Beijing 100084, China)

Abstract: Transformed crown tissue cultures from *Trichosanthes kirilouii* Maxim. were established by Ti plasmid in C58 strains. The crown issues grew well in free- hormone MS medium. Nopaline was inspected in the crown gall and this data showed that T-DNA of Ti plasmid had been transformed successfully. The content of proteins in the tissue was about 130.6mg/g (fresh weight) which was inspected by compound-color methods and its TCN-protein was inspected by SDS-PAGE analysis. The study showed that the production of TCN proteins from crown tissue cultures may be developed in prospect.

Key words: *Trichosanthes kirilowii*; Ti plasmid; The crown culture

栝楼 (*Trichosanthes kirilowii* Maxim) 的块根俗称天花粉, 含有淀粉、皂甙、天花粉蛋白、多种氨基酸及糖类等成分 (Tsao 等, 1986)。Trichosanthes (TCN 纯的药剂制品 GLQ223) 是从栝楼的根中提取出来的蛋白质, 它具有抗病毒、抗肿瘤、抗糖尿病和免疫调节等功效; 尤其是在发现其具有抗艾滋病的功效后更加激发了人们对它的兴趣, TCN 和 TAP29 (Trichosanthes Anti-HIV protein 29Kda) 是其中最引人注目的两种蛋白 (Leun 等, 1986; McGrath 等, 1989)。

Brett 和 Hector (1994) 及邱德有 (1996) 等对栝楼发根培养产生天花粉蛋白进行了研究; 利用基因工程方法产生天花粉蛋白也有报道, 但离工业化生产都还有一定的距离。本

收稿日期: 2000-03-07, 2000-07-13 接受发表

实验是利用根癌农杆菌C58（*Agrobacterium tumefaciens* C58）Ti质粒T-DNA整合到栝楼细胞基因组中，诱导冠瘿组织（Crown gall tissues）发生，冠瘿组织离体培养时具有激素自主、增殖速度较常规细胞培养快，且较毛状根培养易于大规模化生产等优点。利用冠瘿组织培养生产天花粉蛋白可能是一条新途径。

1 材料与方法

1.1 栝楼冠瘿组织的诱导和培养

取栝楼（*Trichosanthes kirilowii* Maxim）种子，先用自来水冲洗干净、晾干；然后在超净工作台上用0.1%升汞消毒，无菌水冲洗3遍，接种到1/2MS培养基上；一周后出现白色的幼根和嫩芽。生长2周后，用胭脂碱型根癌农杆菌C58菌株感染栝楼无菌苗（张荫麟等，1995），诱导出冠瘿瘤。然后，把冠瘿组织放在含有500 mg /L羧苄青霉素的MS琼脂培养基上除菌，待除尽菌后，在不含激素的MS琼脂培养基上继代培养（温度25℃，黑暗），以便用于最适培养基的筛选、培养条件的优化等实验。

1.2 Ti质粒转化的证实

称取新鲜的栝楼块根、冠瘿组织各1 g，研磨后离心（5000r/min，10 min），用毛细管吸取上清液以及Nopalin和Arginine标准品点样在Whatman 3 mm滤纸上；用缓冲液渗湿滤纸，然后电泳（20v/cm），当指示剂甲基绿跑到边缘时停止电泳，顺方向取出电泳纸，用热风吹干，放入0.002%菲醌（溶于无水乙醇和10%NaOH（溶于60%乙醇）等体积混合的染液中染色几分钟，然后风干；最后在254 nm紫外下观察、摄影（Otten等，1978）。

1.3 冠瘿组织中总蛋白的测定

称取50g新鲜的栝楼块根、冠瘿组织，加入1：2的1×PBS（Phosphate Buffer Saline）pH7.2，经破碎（破碎机（XHF-1），30 s 3~4次）、分散（高速分散器，30 s 3~4次）、浸泡（4℃，1~2 d）、离心（8000r/min，15 min），取50 μL上清液+950 μL dH_2O，最后加入5 mL考马斯亮兰溶液；然后用721分光光度计在595 nm处测定其OD值（张龙翔，1981）。用SDS-PAGE测定冠瘿组织中所含蛋白质的分子量（Smbrook等，1992）。

2 结果与讨论

2.1 栝楼冠瘿瘤的诱导和除菌

用胭脂碱型根癌农杆菌C58菌株感染栝楼无菌苗的叶腋处，获得冠瘿瘤，诱导率为80%；然后把它们从茎上切下，放在含有500mg/L羧苄青霉素的MS琼脂培养基上培养，经4次转移获得无菌的冠瘿组织，并筛选长势较好的冠瘿组织继代培养。

2.2 栝楼冠瘿组织基本培养基的筛选

把来自同一株系冠瘿组织分别接种到不含激素的MS、WP、B5、67-V琼脂培养基和液体培养基上进行培养，培养条件为黑暗、25℃。结果（表1）表明，栝楼冠瘿组织在以上不同培养基上生长有明显差异，其中以MS培养基中冠瘿组织生物量收获最大；但总蛋白含量差异不大。

2.3 蔗糖浓度对栝楼冠瘿组织培养的影响

我们以MS为基本培养基，比较了15、20、30、40、50g/L蔗糖浓度，接种量为30 g

(鲜重）/L，培养 28 d 收获栝楼冠瘿组织生物量分别为 396.8，415.4，452.3，428.5，400.7g（鲜重）/L，结果表明以 30g/L 蔗糖培养时冠瘿组织的收获量最大（图 1)。

2.4 栝楼冠瘿组织细胞生长曲线及总蛋白含量的变化

选择 MS 为基本培养基，接种量为 30 g（鲜重）/L，蔗糖浓度为 30g/L，pH = 5.6，黑暗，25℃为培养条件，对栝楼冠瘿组织进行了悬浮培养，观察其细胞生长状态和总蛋白含量的变化。结果（图 2）表明栝楼冠瘿组织在悬浮培养 16 ~ 18 d 期间生长速度最快，为 34.45（鲜重）g/L. d，而总蛋白含量在 24 d 时达到最高值为 130.6mg/g（鲜重)；培养 28 d 栝楼冠瘿组织平均生长速度为 13.35g（鲜重）/L .d，平均蛋白含量为 122.5mg/g（鲜重）。培养 27 d 时冠瘿组织开始老化，所以我们选择悬浮培养 28d 时收获培养物。

表 1　不同基本培养基对栝楼冠瘿组织和总蛋白生产的影响

Table 1　The effect of different basic medium on the growth of crown tissue cultures and production of the total protein

Basic medium	Inoculum (g/L)	Culture days	Harvest biomass① (g/L)	Harvest biomass② (g)	Protein content① (mg/g)	Protein content② (mg/g)
MS	30.0	28	504.2	525.3	134.00	129.00
B5	30.0	28	485.4	492.4	129.23	128.12
67 - V	30.0	28	453.2	476.5	130.19	127.98
WP	30.0	28	443.6	468.4	131.98	127.23

Notes: 1. The weight of crown tissue is fresh weight.　
2. ①② cultured in solid and liquid media respectively

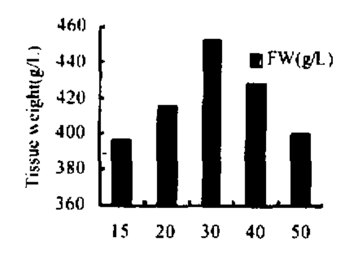


图 1　蔗糖浓度对栝楼冠瘿组织生长的影响

Fig.1　The effect of the concentration of sucrose on the growth of the crown tissues of *T. kirilowii*

FW: fresh weight

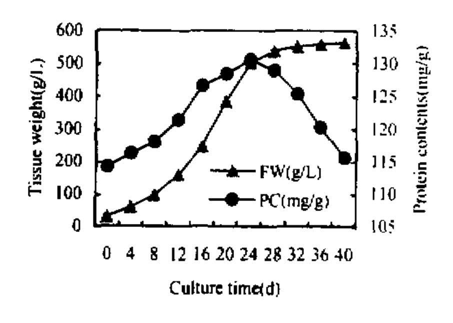


图 2　悬浮培养细胞生长曲线和蛋白含量变化

Fig.2　The time course of production - growth in the suspension

FW: fresh weight; PC: protein contents

2.5 栝楼冠瘿组织中冠瘿碱的检测

根癌农杆菌 C58 菌株 Ti 质粒的 T - DNA 含有胭脂碱合成酶基因，而植物染色体中不含此基因。如果 Ti 质粒将该基因整合到植物染色体中，那么在诱导出来的冠瘿组织中就

能检测到其表达产物胭脂碱，则表明转化成功。我们用高压纸电泳检测了栝楼冠瘿组织两个株系，结果表明都含有胭脂碱（图3-3），证实了Ti质粒中的T-DNA已整合到栝楼冠瘿组织细胞染色体中，并获得表达。

2.6 栝楼冠瘿组织中蛋白的检测

根据用标准蛋白求得的标准曲线 Y = 199.63006R - 7.04429，R = 0.99957 计算出栝楼冠瘿组织中的蛋白含量。结果显示，悬浮培养 24 d 时栝楼冠瘿组织蛋白含量达到最高，为 130.6mg/g（鲜重）。用SDS-聚丙烯酰胺电泳法测定栝楼冠瘿组织中所含蛋白质的分子量，结果表明（图3-2），冠瘿组织中含有的蛋白种类与栝楼块根中含有的蛋白基本相同；且由于冠瘿组织培养具有激素自主、生长快速等优点，为此，利用栝楼冠瘿组织培养系统来生产天花粉蛋白很有开发潜力。

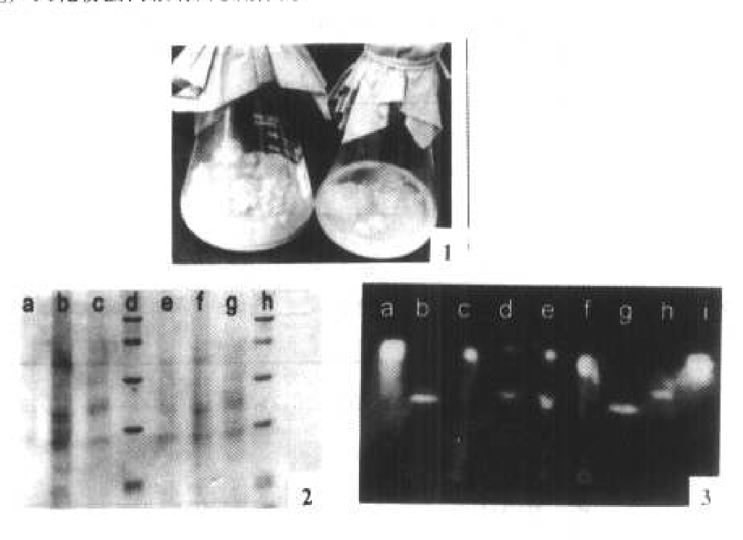


图3 1. 用根瘤农杆菌 C58 感染栝楼无菌苗后在无激素的 MS 培养基上培养 18 天的冠瘿组织；
2. SDS-聚丙烯酰胺电泳图，a，c，e，g：栝楼冠瘿组织，b，f：栝楼块根，，h 标准分子量蛋白；
3. Ti 质粒转化证实图：a，i：arginine，h：octopine，b，g：nopaline，d，e 栝楼冠瘿组织，c，f：栝楼块根。

Fig.3 1. Crown tissues induced from *T. kirilowii* which were cultured for 18 days on hormone-free media after being infectedby *Agrobacterium tumefaciens* C58； 2. SDS-PAGE，，a，c，e，g：crown tissues of *T. kirilowii*，b，f：roots of *T. kirilowii* d，h：standard protein markers； 3. proofs of the transformation of Ti plasmid，a，i：arginine，h：octopine，b，g：nopaline，d，e：crown tissues，c，f：roots of *T. kirilowii*

〔参考文献〕

张龙翔，1981. 生化实验方法和技术〔M〕. 北京：高等教育出版社

张荫麟，宋经元，祁建军等，1995. 丹参的冠瘿组织培养和丹参酮的产生〔J〕. 生物工程学报，**13**（3）：317-319

邱德有，朱至清，1996. 利用栝楼毛状根培养系统生产天花粉蛋白的研究〔J〕. 植物学报，**38**（6）：439-443

金冬雁，黎孟枫等译，1992. 分子克隆.〔M〕北京：科学出版社，852-897

Brett J Savary，Hector E Flores 1994. Biosynthesis of defense-related proteins in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* var

japonicum (Kitum) [J]. *Plant Physiol*, **106**: 1195 ~ 1204

Leun K N, Yeung H W, Leung S O, 1986. The immunomodulatory and antitumor activities of trichosanthin – an abortifacient protein isolated from Tian – hua – fen (*Trichosanthes kirilowii*) [J]. *Asian Pacific J Allergy Immunol*, **4**: 111 ~ 120

McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E, 1989. GLQ223: An inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of cymphocyte and mononuclear phagocyte lineages [J]. *PNAS USA*, **86**: 2844 ~ 2848

Otten L A B M, Schitperoort R A, 1978. A rapid micro scale method for the detection of lysoping and nopaline dehydrogenas activities [J], *Biochem Biophys Acta*, **78**, **57**: 497 ~ 604

Tsao S W. Yan K T. Yeung H W. 1986. Selective killing of choriocarcinoma cells in vitro by trichosanthin. a plant protein purified from root tubers of the Chinese medicinal herb *Trichosanthes kirilowii* [J]. *Toxicon*. **24**: 831 ~ 840